

10/507202

DT04 Rec'd PCT/PTO 14 SEP 2004

DOCKET NO.: 258563US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Sven MOESGAARD et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/DK03/00167

INTERNATIONAL FILING DATE: March 14, 2003

FOR: A SELENIUM YEAST PRODUCT, A METHOD OF PREPARING A SELENIUM YEAST PRODUCT AND THE USE OF THE PRODUCT FOR PREPARING FOOD, A DIETARY SUPPLEMENT OR A DRUG

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313


Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Denmark	PA 2002 00408	15 March 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/DK03/00167. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

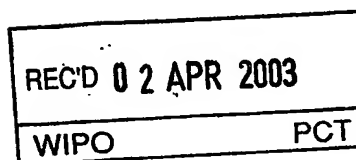
Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

PCT/DK 03/00167
10. / 50 7 2 0 1

14 SEP 2004



Kongeriget Danmark

Patent application No.: PA 2002 00408
Date of filing: 15. March 2002
Applicant: PHARMA NORD ApS

This is to certify the correctness of the following information:

The attached document is a true copy of the following document:

- The specification, claims, abstract and drawings as filed with the application on the filing date indicated above.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Patent- og Varemærkestyrelsen
Økonomi- og Erhvervsministeriet

20 February 2003

John Nielsen

15 MRS. 2002

Modtaget

1

TEKNISK OMRÅDE:

Den foreliggende opfindelse angår et selengærprodukt til brug i fødevarer, kosttilskud eller lægemidler, og som indeholder betydelige og ensartede mængder af letfordøjeligt og veltolerabelt, organisk bundet selen. Endvidere angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af dette selengærprodukt samt anvendelse af selengærproduktet til fremstilling af en fødevare, et kosttilskud eller et lægemiddel.

KENDT TEKNIK:

Selen er et grundstof, som er essentielt i menneskets ernæring. Tilførsel af selen sker gennem kosten, som imidlertid har et varierende indhold af selen. I store dele af verden dyrkes afgrøder med ringe indhold af selen, idet mængden af dette grundstof i jordbunden er beskednen.

Betydningen af selen for mennesket er fastslået gennem et større antal undersøgelser. Selen indbygges i forskellige organiske molekyler, herunder især aminosyrer. l-selenomethionin, selenocystein, selenocystin og selenoethionin er de vigtigste forbindelser. Selen indgår således i proteiner, der har strukturel betydning i kroppen. Endvidere er selen en vigtig bestanddel af en række enzymer, som har indflydelse på stofskifte, forplantning, kræftforebyggelse, immunforsvar og psyke hos mennesket (Rayman, M., The importance of selenium to human health, Lancet 356:233-241 (2000)).

På grund af det ofte utilstrækkelige indhold af selen i almindelig kost er det hensigtsmæssigt at tilføre selen i form af berigelse, kosttilskud eller lægemidler. Disse kan have et indhold af uorganisk selen som f.eks. selenit, eller de kan bestå af organiske kilder, herunder selengær. Der er væsentlig forskel på absorption og toksicitet af uorganisk og organisk selen, idet uorganiske forbindelser sædvanligvis absorberes betydeligt dårligere, og tillige er mere toksiske end organiske kilder til selen. En ofte anvendt kilde til organisk selen er gær med indhold af selen.

Ved dyrkning af gær er det muligt at tilføre næringsmediet selen i form af uorganiske forbindelser, herunder natriumselenit og natriumselenat. Selen, der tilføres næringsmediet på denne måde, optages i vid udstrækning af gær og indbygges i organiske forbindelser, herunder l-selenomethionin.

- 5 Selengær kan fremstilles ved brug af en række arter af gær, herunder *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii sequela* og *Saccharomyces torula*, og ved anvendelse af forskellige dyrkningsbetingelser. Herved kan dannes et variabelt udvalg af organiske forbindelser af selen i gæren. Reproducerbarhed ved brug af kendte fremgangsmåder kan være utilfredsstillende. Dårlig reproducerbarhed har givet anledning til manglende accept
- 10 af selengær hos myndigheder, forskere og forbrugere. Den Videnskabelige Komité for Fødevarer angiver, at l-selenomethionin-indholdet i selengær varierer mellem 20 og 50%. (European Commission, Scientific Committee on Food, Opinion on substances for nutritional purposes which have been proposed for use in the manufacture of foods for particular nutritional purposes ("PARNUTS") 12. maj 1999, side 5. Scientific Committee on Food
- 15 on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium, 11. oktober 2000, side 2). Til anvendelse i kosttilskud eller lægemidler er det vigtigt, at de væsentlige forbindelser af selen (specier) forekommer i ensartet koncentration. Dette muliggør langtidsstudier af betydningen af selen, hvor reproducerbarheden fra produktion til produktion er af afgørende betydning for tolkning og anvendelse af resultater fra studierne.
- 20 Selengær som handelsvare fremstilles almindeligvis ved dyrkning på melasse, som har varierende sammensætning. Det er kendt fra litteraturen, at forskellige typer af selengær giver anledning til varierende optagelighed og dermed afvigende respons (Clausen, J. m.fl., A comparison of ten selenium supplementation products, Selenium in Medicine and Biology, Walter de Gruyter & Co 305 - 14 (1988)). En række patenter beskriver dyrkning af
- 25 selengær med forskellig koncentration af selen. Således beskriver US Patent 4.530.846 dyrkning af selengær med omkring 1.000 ppm selen. Patentet angiver imidlertid ikke, hvorledes selen er bundet i gæren, eller i hvilket omfang fremgangsmåden kan reproduceres.

Patentansøgning WO98/37172 omhandler ligeledes dyrkning og anvendelse af selengær. Fremgangsmåden ved dyrkning indebærer opblanding af et vandopløseligt salt af selen med et næringsmedium, hvorefter dette tilføres en vandig opslæmning af gær. Den fremkomne selengær har et indhold af selen, der ikke opdeles i konstante, entydige forbindelser. Mulighed for at opnå ensartet udbytte og sammensætning af selenforbindelser er heller ikke beskrevet.

Det er kendt, at gær og andre mikroorganismer kan dyrkes på et medium, som indeholder et mindstemål af næringsstoffer, et såkaldt minimalmedium. Imidlertid anvendes denne fremgangsmåde ikke i almindelighed industrielt, fordi den kan være forbundet med ringe udbytte og uønsket sammensætning af mikroorganismerne. Det er derfor overraskende, at man ved dyrkning på et minimalmedium i overensstemmelse med denne opfindelse kan opnå et godt udbytte og en reproducerbar sammensætning af selengær, som er optimal i menneskets ernæring.

Nærværende opfindelse angår således en fremgangsmåde til fremstilling af et gærprodukt, som indeholder betydelige og ensartede mængder af fordøjeligt, organisk bundet selen. Den frembragte gær er et pulver, der kan anvendes direkte eller på sædvanlig måde presses til tabletter. Disse kan markedsføres som fødevare, kosttilskud eller lægemiddel.

KORT BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN:

Opfindelsen angår derfor i et første aspekt et selengærprodukt til brug i fødevarer, kosttilskud eller lægemidler, som er ejendommeligt ved et indhold af organiske selenforbindelser på mellem 1.000 og 1.600 ppm, fortrinsvis mellem 1.100 ppm og 1.500 ppm, mest fortrinsvis mellem 1.200 ppm og 1.400 ppm, at indholdet af 1-selenomethionin konstant udgør mindst 55% af det samlede indhold af selen, og at indholdet af uorganiske selenforbindelser udgør højst 1% af det samlede indhold af selen.

Det fremkomne produkt er tillige karakteriseret ved en human absorption på mere end 85%.

I et andet aspekt angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af et selengærprodukt til brug i fødevarer, kosttilskud eller lægemidler, hvorved gæren dyrkes under aerobe
5 forhold, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved

i) at næringsstoffer tilledes gæren under dyrkningen i et omfang, som svarer til omsætningen af disse næringsstoffer i gæren;

ii) at glucose og/eller maltose er eneste kilder til carbon i tilløbsmediet;

iii) at koncentrationen af ethanol under dyrkningen ikke overstiger 1%, foretrukket 0,5%,
10 og mest foretrukket 0,2%;

iv) at pH under dyrkningen opretholdes mellem 4,0 og 6,0, foretrukket mellem 4,4 og 5,7, mest foretrukket mellem 4,7 og 5,4, såsom 5,0;

v) at tilløbsmediet iblandes et vandopløseligt salt af selen i en mængde svarende til mellem 1.000 og 1.500 ppm, beregnet på tørstof i gæren.

15 I et tredje aspekt angår opfindelsen et selengærprodukt fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

I et fjerde aspekt angår opfindelsen en fødevare, et kosttilskud eller et lægemiddel, som omfatter et selengærprodukt ifølge opfindelsen.

I et femte aspekt angår opfindelsen anvendelse af selengærproduktet ifølge opfindelsen til
20 fremstilling af en fødevare, et kosttilskud eller et lægemiddel.

DETALJERET BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN:

Før den detaljerede gennemgang af opfindelsens forskellige udførelsesformer skal en række specifikke for opfindelsens hovedaspekter relevante betegnelser defineres.

Definitioner.

- 5 Minimalmedium: Medium, der indeholder den mindste mængde af næringsstoffer, som er nødvendig for at opnå vækst af gær.

Farmaceutisk kvalitet: Egenskaber ved produkter, som er beskrevet i en national farmakopé.

Startmedium: Blanding af vand og øvrige næringsstoffer, der podes med gær.

- 10 Tilløbsmedium: Næringsstoffer, der tilføres startmedium/kulturen efter påsætning af gær.

Zak-metoden: Fremgangsmåde til dyrkning af gær, hvorved denne påsættes et startmedium, hvorefter der under aerobe forhold tilføres næringsstoffer via et tilløbsmedium. Tilførsel af næringsstoffer sker under aerobe forhold med en hastighed, der svarer til optagelsen af disse næringsstoffer i gær. Herved dannes der ved korrekt styring kun lidt alkohol.

- 15 Den dannede alkohol omsættes af gæren i den sidste del af dyrkningen. Metoden er klassisk og betegnes Z-metoden. Den er som princip udviklet af Søren Sak og beskrevet i dansk patent nr. 28507 (1921).

Human absorption: Forskel mellem indtaget mængde isotop og udskilt mængde isotop i afføring. Human absorption beregnes i procent af den indtagne mængde isotop.

- 20 De hidtil kendte metoder til fremstilling af selengærprodukter benytter som omtalt tidligere hovedsageligt melasse som carbonkilde, og der hvor der er benyttet et glucosebaseret me-

dium, WO98/37172, afviger denne metode fra metoden ifølge opfindelsen, idet der ikke til stadighed sikres en tilførsel af næringsstoffer og selen, der svarer til cellevæksten. Endvidere sker iblanding af selen over et forholdsvis kort tidsrum, hvilket vanskeliggør dannelse af organiske forbindelser af selen, der har særlig betydning i menneskets ernæring.

Næringsstoffer til dyrkning af gær ifølge opfindelsen omfatter kilder til carbon og nitrogen samt mikronæringsstoffer i form af vitaminer og mineraler. Carbon skal være i en form, der umiddelbart kan optages under dyrkningen. Det må derfor være letopløseligt i vand og have en sammensætning, der muliggør omsætning ved hjælp af de enzymer, som findes i gæren. Hertil kan regnes glucose og maltose, som kan oprenses til glucosesirup på en sådan måde, at de kan anvendes som næringsstof for mikroorganismer, der producerer fødevarer, kosttilskud eller lægemidler. Som kilde til nitrogen er det muligt at gøre brug af uorganiske forbindelser, herunder ammoniak. Denne må have en sådan renhed, at der ikke forekommer toksicitet eller dannelse af uønskede forbindelser. Gærens stofskifte er ikke fuldstændig kendt, hvorfor det er nødvendigt at tilføre mikronæringsstoffer i form af gærekstrakt, som er beskrevet i farmakopé.

Gær ifølge opfindelsen kan således fremstilles på grundlag af råvarer i farmaceutisk kvalitet, der sammensættes på en sådan måde, at gæren har et mindstemål af næringsstoffer til rådighed for vækst. En typisk fremgangsmåde ved dyrkning af gæren vil omfatte nedenstående trin:

- 1) Tilvirkning af næringsmedium
- 2) Podning med påsætningsgær
- 3) Dyrkning
- 4) Høst
- 5) Vask
- 6) Varmebehandling
- 7) Tørring

Tilvirkning af næringsmedium sker ved opløsning af sukkerstoffer, vitaminer og mineraler i vand, der opvarmes til mellem 24 og 37°C, fortrinsvis mellem 26 og 34°C, og bedst mellem 28 og 32°C inden påsætning af gær.

Podning med påsætningsgær sker til det færdige og opvarmede næringsmedium, idet gærcellerne opslemmes i mediet under omrøring med en frekvens på mellem 1 og 2 Hz. Selengær kan fremstilles ved brug af en række arter, herunder *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii sequela* og *Saccharomyces torula*. Blandt disse er *Saccharomyces cerevisiae* generelt at betragte som en art, der er velegnet til menneskelig indtagelse, og den har en udbredt anvendelse til fremstilling af brød og alkohol. Til fremstilling af et selengærprodukt ifølge opfindelsen er det en fordel at benytte en produktionstamme, som er genetisk stabil og derved mindre tilbøjelig til at undergå mutation. I en udførelsesform ifølge den foreliggende opfindelse benyttes således stammen ATCC Nr. 74.366, uden at opfindelsen dog er begrænset hertil.

Dyrkning finder sted på grundlag af næringsmedium, der tilvirkes som et særligt minimalmedium og podes med den ovenfor beskrevne påsætningsgær. Endvidere tilføres yderligere carbohydrater i form af glucose og/eller maltose. Som kilde til nitrogen iblandes en vandig opløsning af ammoniak. For at sikre størst mulig vækst og modvirke dannelse af alkohol tilledes store mængder luft, fortrinsvis atmosfærisk luft, der indeholder tilstrækkelig oxygen. Ved fremstilling i stor målestok er det i praksis vanskeligt at opnå en fuldstændig oxydering. Dette kan ændre gærens næringsbehov en smule. Standsning af dyrkningen sker ved en koncentration af gær på ca. 4% w/w, beregnet på det samlede indhold af næringsmedium og gær. Tilførsel af næringsstoffer sker under aerobe forhold med en hastighed, der svarer til optagelsen af disse næringsstoffer i gær. Herved dannes der ved korrekt styring kun lidt alkohol. Den dannede alkohol omsættes af gæren i den sidste del af dyrkningen.

I praksis styres tilledningen af næringstoffer i den rette mængde ved løbende at måle den mængde alkohol i form af ethanol, som dannes under væksten. Hvis tilledningen af

- næringsstoffer sker for langsomt, vil der ikke dannes alkohol, og hvis tilledningen sker for hurtigt, vil der dannes betydelige mængder af alkohol. Den til enhver tid tilstedeværende mængde af alkohol bør derfor ikke overstige 1%, foretrukket 0,5%, og mest foretrukket 0,2%. Endvidere kan pH af vækstmediet benyttes som en indikator for opretholdelsen af
- 5 den rette balance mellem forbrug og tilledning af næringsstoffer, og pH kontrolleres og reguleres derfor under væksten således, at denne holdes mellem 4,0 og 6,0, foretrukket mellem 4,4 og 5,7, mest foretrukket mellem 4,7 og 5,4, såsom 5,0.

- Høst indebærer adskillelse af den dyrkede gær fra næringsmediet. Dette sker bedst ved centrifugering, hvorved der fremkommer en koncentreret gærfløde, som indeholder ca.
- 10 20% gær w/w.

Vask har til formål at fjerne overskydende næringsstoffer i gærfløden. Den foregår mest hensigtsmæssigt ved tilledning af vand, hvorefter der foretages centrifugering, således at der fremkommer gærfløde. På denne måde vaskes gæren 2 til 6 gange og fortrinsvis 4 gange, hvorved praktisk taget alle ekstracellulære næringsstoffer fjernes fra gærfløden.

- 15 Varmebehandling gennemføres med henblik på at dræbe gærcellerne, således at den heri forekommende selen bliver tilgængelig ved menneskets fordøjelse. Varmebehandling medfører tillige en vidtgående sprængning af gærcellerne. En hensigtsmæssig varmebehandling kan gennemføres som pasteurisering i pladevarmeveksler ved en temperatur på 87°C og en holdetid på 30 sek.

- 20 Tørring af gæren kan ske ved almindelige fremgangsmåder til tørring af organisk materiale, herunder frysetørring, tromletørring, bakketørring eller forstøvningstørring, fortrinsvis forstøvningstørring. Ved forstøvningstørring sker fjernelse af vand ved en indgangstemperatur for luft på mellem 160 og 240°C, fortrinsvis mellem 180 og 220°C og bedst omkring 200°C. Udgangstemperaturen kan i sammenhæng hermed være fra 70 til 90°C,
- 25 fortrinsvis 80 til 90°C og bedst omkring 86°C. Det fremkomne pulver har et indhold af vand på mellem 4 og 9%, fortrinsvis mellem 6 og 9% og bedst omkring 8%. Pulveret kan

efterfølgende behandles ved befugtning med vand og efterfølgende tørring, hvorved evnen til senere at optage vand forbedres.

Selengær ifølge opfindelsen kan anvendes til fremstilling af fødevarer, kosttilskud eller lægemidler, enten som eneste kilde til selen eller i kombination med andre selenholdige ingredienser.

Opfindelsen angår derfor også en fødevare, et kosttilskud eller et lægemiddel, der som kilde til selen anvender selengær ifølge opfindelsen.

I en udførelsesform for opfindelsen omfatter anvendelsen et produkt, der indeholder sprængemiddel, flydemiddel samt selengær. Denne blanding trykkes til en tablet med et indhold på mellem 25 og 800 μg selen, særligt mellem 40 og 300 μg selen og især 50 til 200 μg selen per tablet.

Opfindelsen vil ud over det her beskrevne anvendelsesområde dog også kunne anvendes til andre typer fødevarer, der ønskes beriget med selen, såsom mel, andre pulverformige fødevarer samt drikkevarer.

Opfindelsen belyses nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

1 a)

I dette eksempel anvendes en fermentor med et rumfang på 0,014 m³.

Der fremstilles et næringsmedium med følgende sammensætning af råvarer i farmaceutisk kvalitet ved begyndelse af dyrkningen:

	Vand	Ph.Eur.	5.400 g
	Glucosesirup	Ph.Eur.	31,8 g
5	KH ₂ PO ₄	Ph.Eur.	25 g
	Ammoniakvand 2,5%	Ph.Eur.	114 g
	Biotin (0,01%)	Ph.Eur.	2,1 ml
	Thiaminhydrochlorid (1,0%)	Ph.Eur.	2,5 ml
	Calciumpantothenat	Ph.Eur.	0,08 g
10	Gærekstrakt	USP	75 g
	Jernsulfat	Ph.Eur.	0,10 g
	Magnesiumsulfat	Ph.Eur.	5,0 g
	Mangansulfat	Ph.Eur.	0,033 g
	Zinksulfat	Ph.Eur.	0,033 g
15	Efter indstilling af temperaturen til 30°C iblandes 5 g påsætningsgær. Det podede næringsmedium gennemblæses med steril atmosfærisk luft i en mængde på 20 liter pr. min. Omrøring foregår med spindel med en frekvens på 17 Hz. Til regulering af pH anvendes svovlsyre, således at pH holdes mellem 4,7 og 5,4. Det kontrolleres, at ethanol ikke overstiger 0,2%, og koncentrationen af ethanol holdes iøvrigt så tæt ved 0 som muligt.		
20	Under dyrkningen iblandes næringsstoffer i tilløbet i følgende mængde:		

Glucosesirup	Ph.Eur.	1.060,5 g
Ammoniakvand 2,5%	Ph.Eur.	1.451 g

Endvidere iblandes natriumselenit i ammoniakvand 2,5%, således:

25	Natriumselenit	Ph.Eur.	1,2758 g
----	----------------	---------	----------

Tilledning af glucosesirup, ammoniakvand og natriumselenit sker med en hastighed, der svarer til omsætning af stofferne i gæren. Dette kontrolleres ved til stadighed at måle dannelsen af alkohol. Koncentration af alkohol holdes tæt på 0.

Tilførsel af ammoniakvand (2,5%) standses efter 18 timer.

- 5 Efter 19 timer standses dyrkningen.

Høst af gæren sker ved at overføre mediet med gæren til en centrifuge. Her adskilles gærfløde fra overskydende medium i løbet af 5 min. Den således fremkomne gærfløde med et indhold af tørstof på ca. 20% iblandes 5.000 g vand. Herefter centrifugeres gærblandingen igen. Vaskevand bortskaffes, og den fremkomne gærfløde iblandes 5.000 g vand. Processen gentages 4 gange for at adskille gærceller fra medium.

- 10

Den vaskede gærfløde føres gennem en pladepasteur, hvor den udsættes for en varmebehandling ved 87°C med en holdetid på 30 sek. Umiddelbart efter varmebehandling afkøles gærfløden til 4°C i en pladepasteur. Mængden af gærfløde er 1.897,5 g.

- 15 Gærfløden overføres til en frysetørrer. Efter indfrysning ved -40°C i 24 timer sublimerer vandet i løbet af 18 timer. Der fremkommer herved 380 g tørret selengær med et vandindhold på 0,2% og en koncentration af selen på 1.380 ppm i tørstof. Ernæringsmæssige egenskaber og reproducerbarhed af det således fremstillede selengærprodukt fastsættes således som beskrevet nedenfor i eksempel 2, 4 og 5.

1 b)

- 20 Gær fremstilles i overensstemmelse med eksempel 1 a ovenfor, men der anvendes en fermentor med et rumfang på 150 m³. Næringsmediet sammensættes af tilsvarende bestanddele i det samme indbyrdes forhold og har en samlet vægt på 56.848 kg.

Tilledning sker i form af glucosirup og ammoniakvand 2,5% på samme måde som i eksempel 1 a. Der medgår hertil 13.500 kg glucosesirup og 1.410,5 kg ammoniakvand 25%. Selen i form af natriumselenit iblandes i en mængde på 15 kg. Tilledningen af ammoniakvand standses efter 18 timer, og dyrkningen standses efter 19 timer.

- 5 Vask og varmebehandling af gæren foregår efter principper som beskrevet i eksempel 1a.

Tørring af gæren sker ved forstøvningstørring i tørretårn med roterende forstøverhjul. Frekvens af forstøverhjul sættes til 167 Hz. Temperatur af luft til tørring indstilles til 200°C. Der fremkommer en udgangstemperatur på 86°C. Den samlede mængde pulver med et vandindhold på 7% udgør 5.035 kg. Koncentration af selen er 1.355 ppm på tørstof. Ernæringsmæssige egenskaber og reproducerbarhed af det således fremstillede selengærprodukt fastsættes således som beskrevet nedenfor i eksempel 2, 4 og 5.

EKSEMPEL 2

Fordøjelighed og absorption af selengær

- 15 2 a) In vitro fordøjelighed af selen

Som grundlag for bestemmelse af in vitro fordøjelighed af selengær anvendes en videreudvikling af Plantedirektoratets metode 9.1 af 15. november 1994 til bestemmelse af enzymfordøjeligt organisk stof hos svin (EFOS svin). Fremgangsmåden er ændret, således at den svarer til forholdene i menneskets fordøjelse. Enzymer, der kan nedbryde cellulose, indgår således ikke i denne in vitro undersøgelse.

Princippet er behandling med pepsin, efterfulgt af påvirkning med pancreatin. Uopløst prøvemateriale filtreres fra og tørres. Ved at sammenholde bestemmelser af selen i den oprindelige prøve med indhold i filtrat og retentat beregnes fordøjeligheden af selen.

- Således blandes selengær ved pH 2,0 med pepsin og inkuberes ved 40°C i 75 min. efterfulgt af behandling med pancreatin ved pH 6,8 ved 40°C i 3 timer og 30 min. Herefter filtreres ved brug af vakuum, og indhold af selen i henholdsvis filtrat og retentat bestemmes. Indhold af selen i filtratet i procent af samlet indhold af selen i prøven er udtryk for in vitro
- 5 fordøjelighed af selengæren.

Der opnås en selengær med følgende karakteristika:

Fordøjeligt selen: 99%

2 b) In vivo absorption og retention af selen

- Som grundlag for bestemmelse af in vivo fordøjelighed indgives selengær ifølge opfindelsen, hvor der til dyrkning er anvendt en stabil isotop med et indhold af selen-77 på 99,3%. Da naturligt forekommende selen kun indeholder 7,8% Se-77 og samtidigt indeholder 49,82% Se-80, er det muligt ved måling af disse isotoper via ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) at bestemme andelen i humant materiale, der stammer fra en sådan tilførsel af isotop.
- 10
- 15 Bestemmelse af in vivo absorption, retention og biotilgængelighed sker iøvrigt som følger:

- Til 12 mandlige deltagere i alderen fra 20 til 55 år indgives en engangsdosis selengær svarende til 300 µg selen-77. Deltagerne opsamler i en periode på 5 dage faeces og urin, og der tages i perioden 11 blodprøver. Til kontrol for opsamling af faeces og urin indgives henholdsvis PABA (para-amino-benzoic-acid) og plast-rør, der kan genfindes dels i urin
- 20
- og dels i faeces som kontrol på opsamlingen. Den absorberede mængde selen-77 bestemmes ved at sammenholde indtagelse af selen-77 med udskillelse gennem faeces.

Retentionen (den tilbageholdte mængde) bestemmes som indgivet tracermængde minus udskillelse via faeces og urin i forhold til den indgivne tracermængde. Blodprøverne anvendes til at beskrive farmakodynamikken.

Der opnås følgende karakteristika for absorption og retention af selengæren ifølge opfindelsen:

Absorptionen er 89%. Retentionen er 74%.

2 c) In vivo dosis/respons ved langtidsindtagelse

En gruppe på 49 personer indtog blindet i en sammenhængende periode på 2 år dagligt en tablet med indhold af 0, 100, 200 eller 300 µg selen i form af selengær efter opfindelsen.

- 10 Endvidere indtog deltagerne gennem føden den mængde af selen, som findes naturligt i kosten (ca. 50 µg/dag). Efter 2 års forløb, hvor ligevægt mellem optagelse og udskillelse er opnået, blev indhold af selen i helblod bestemt.

Følgende resultater blev opgjort:

15

Indtag pr. dag (µg)	Antal deltagere	Middelværdi af selen i helblod (µg/l)	Optagelse af selen pr. µg (µg/l/µg)	Stigning i forhold til placebo (%)
0	17	95,6	-	0
100	11	177,2	0,816	85
200	8	307,6	1,06	222
300	13	440,8	1,15	361

På grundlag af ovenstående udfald kunne en lineær sammenhæng mellem indtaget dosis af selengær og indhold af selen i helblod fastslås og udtrykkes på følgende måde:

$$\text{Selen i helblod } (\mu\text{g/l}) = 1,12 \times \text{indtag } (\mu\text{g/dag}) + 38$$

- Den fundne respons på selengær ifølge opfindelsen overgår, hvad der tidligere er beskrevet for gærsele. (Schrauzer, G.N., Selenium in human nutrition, Bioinorganic Chemistry, 8:303-318 (1978)).

2 d) Måling af bivirkninger ved langtidsindtagelse

- Selengær ifølge opfindelsen i doser på 100, 200 eller 300 μg eller placebo blev i en periode på 1 - 2½ år givet til 806 personer i 4 ligeligt fordelte grupper. Perioden omfatter ca. 1400 personår. I denne periode blev der undersøgt for tolerance og bivirkninger hos samtlige personer. 2,6% (21 af de 806 personer) rapporterede bivirkninger. Før randomiseringen blev brudt, blev bivirkningerne kategoriseret som enten milde (17 personer), moderate (4 personer) eller alvorlige (0 personer).

- Efter brydning af randomiseringen viste bivirkningerne sig at fordele sig tilfældigt på grupperne, idet 8 relaterede sig til placebo, 8 til 200 μg Se og 6 til 300 μg Se. Det konkluderedes, at bivirkningerne var insignifikante og ikke relaterede sig til selengær ifølge opfindelsen.

EKSEMPEL 3

Tablet:

- Fremstilling af tablet af selengær ifølge opfindelsen sker ved anvendelse af følgende ingredienser:

Selengær efter opfindelsen

5	Tablethjælpestoffer:	mikrokrystallinsk cellulose
		siliciumdioxid
		magnesiumsalte af fedtsyrer
	Flydemiddel:	dicalciumphosphat
	Overfladebehandlingsmiddel:	hydroxypropylmethylcellulose
		talkum
	Farvestof:	titandioxid

- 10 Ingredienserne blandes på sædvanlig måde og presses til tabletter, således at hver tablet indeholder 100 µg selen hidrørende fra selengær.

EKSEMPEL 4

Speciering af selengær

- 15 En selengær dyrket på traditionel måde ved brug af melasse samt 2 batch selengær ifølge opfindelsen blev undersøgt for indhold af forskellige forbindelser af selen. Prøverne blev i oxygenfrie omgivelser underkastet syrehydrolyse med thioglycolsyre som stabilisator. Indhold af seleno-methionin og natriumselenit blev herefter bestemt ved HPLC mod laboratoriereferencer.

- 20 Selengær dyrket på melasse havde et indhold på 49% selenomethionin af den ekstraherbare og HPLC-tilgængelige del, medens selengær ifølge opfindelsen ved to uafhængige produktions-batch viste et indhold på henholdsvis 72,8 og 72,9% selenomethionin af den ekstraherbare og HPLC-tilgængelige del.

Den ekstraherbare del af totalselen findes som 95 - 101%. Heraf kan ca. 80% undersøges ved brug af HPLC. Den mindste sande mængde af l-seleno-methionin af totalselen er

således $72,8 \% \times 95\% \times 80\% = 55,3\%$ Den højeste mulige sande mængde er ca. 90%. Den målte mængde af natriumselenit er mindre end 1%. Til bestemmelse af specier af selen kan anvendes fremgangsmåde beskrevet af Erik H. Larsen m.fl. (Larsen, E.H. m.fl., J. Anal. At. Spectrom., 16, 1403-1408, 2000).

- 5 Der lægges i eksemplet vægt på reproducerbarheden snarere end den endelige sande mængde.

EKSEMPEL 5

In vivo absorption af selengær og uorganisk selen

- 10 På samme måde som i anvendelseseksempel 2 b blev der indgivet enten selengær ifølge opfindelsen eller uorganisk selen-77 til de samme 12 forsøgspersoner. Human absorption af de to kilder til selen var henholdsvis 89% for selengær ifølge opfindelsen og 23% for uorganisk selen.

15 MRS. 2002

Modtaget

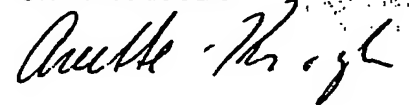
PATENTKRAV

1. Selengærprodukt til brug i fødevarer, kosttilskud eller lægemidler **k e n d e t e g n e t** ved et indhold af organiske selenforbindelser på mellem 1.000 og 1.600 ppm, fortrinsvis mellem 1.100 ppm og 1.500 ppm, mest fortrinsvis mellem 1.200 ppm og 1.400 ppm, at indholdet af l-selenomethionin konstant udgør mindst 55% af det samlede indhold af selen, og at indholdet af uorganiske selenforbindelser udgør højst 1% af det samlede indhold af selen.
2. Fremgangsmåde til fremstilling af et selengærprodukt til brug i fødevarer, kosttilskud eller lægemidler, hvorved gæren dyrkes på et minimalmedium under aerobe forhold **k e n d e t e g n e t** ved
- i) at næringsstoffer tilledes gæren under dyrkningen i et omfang, som svarer til omsætningen af disse næringsstoffer i gæren;
 - ii) at glucose og/eller maltose er eneste kilder til carbon i tilløbsmediet;
 - 15 iii) at koncentrationen af ethanol under dyrkningen ikke overstiger 1%, foretrukket 0,5%, og mest foretrukket 0,2%;
 - iv) at pH under dyrkningen opretholdes mellem 4,0 og 6,0, foretrukket mellem 4,4 og 5,7, mest foretrukket mellem 4,7 og 5,4, såsom 5,0; og
 - v) at tilløbsmediet iblandes et vandopløseligt salt af selen i en mængde svarende til mellem
- 20 1.000 og 1.500 ppm, beregnet på tørstof i gæren.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, **k e n d e t e g n e t** ved, at minimalmediet er sammensat af råvarer af farmaceutisk kvalitet.

4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 2 - 3, k e n d e t e g n e t ved, at gæren omfatter en art tilhørende slægten *Saccharomycetaceae*, fortrinsvis *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii sequela* og/eller *Saccharomyces torula*.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at gæren er *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Selengærprodukt ifølge krav 1, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge krav 2 - 5.
7. Fødevarer k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter et selengærprodukt ifølge krav 6.
8. Kosttilskud k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter et selengærprodukt ifølge krav 6.
9. Lægemiddel k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter et selengærprodukt ifølge krav 6.
10. 10. Anvendelse af selengærproduktet ifølge krav 6, til fremstilling af en fødevarer.
11. Anvendelse af selengærproduktet ifølge krav 6, til fremstilling af et kosttilskud.
12. Anvendelse af selengærproduktet ifølge krav 6, til fremstilling af et lægemiddel

for Pharma Nord ApS

Chas. Hude A/S



Selengærprodukt, fremgangsmåde til fremstilling af et selengærprodukt samt anvendelse af produktet til fremstilling af en fødevare, et kosttilskud, eller et lægemiddel.

SAMMENDRAG.

- Selengærprodukt til brug i fødevarer, kosttilskud eller lægemidler, som indeholder betyde-
- 5 lige og ensartede mængder letfordøjeligt organisk bundet selen, hvori indholdet af organiske selenforbindelser er på mellem 1.000 og 1.600 ppm, fortrinsvis mellem 1.100 ppm og 1.500 ppm, mest fortrinsvis mellem 1.200 ppm og 1.400 ppm, og hvori indholdet af 1-selenomethionin konstant udgør mindst 55% af det samlede indhold af selen, og hvori indholdet af uorganiske selenforbindelser udgør højst 1% af det samlede indhold af selen.
- 10 Endvidere fremgangsmåde til fremstilling af et selengærprodukt til brug i fødevarer, kosttilskud eller lægemidler, hvorved gæren dyrkes på et minimalmedium under aerobe forhold, samtidig med at næringsstoffer tilledes gæren under dyrkningen i et omfang, som svarer til omsætningen af disse næringsstoffer i gæren; at glucose og/eller maltose er eneste kilder til carbon i tilløbsmediet; at koncentrationen af ethanol under dyrkningen ikke
- 15 overstiger 1%, foretrukket 0,5%, og mest foretrukket 0,2%; at pH under dyrkningen opretholdes mellem 4,0 og 6,0, foretrukket mellem 4,4 og 5,7, mest foretrukket mellem 4,7 og 5,4, såsom 5,0; og at tilløbsmediet iblandes et vandopløseligt salt af selen i en mængde svarende til mellem 1.000 og 1.500 ppm, beregnet på tørstof i gæren.